

结核分枝杆菌乙胺丁醇耐药机制的研究进展

王婷, 焦伟伟, 申阿东

首都医科大学附属北京儿童医院, 北京市儿科研究所, 儿童呼吸道感染性疾病研究北京市重点实验室, 教育部儿科重大疾病研究重点实验室, 北京 100045

摘要: 耐多药结核病的出现和流行对结核病的防控造成了严重威胁。乙胺丁醇(Ethambutol, EMB)是一线抗结核药物, 常与异烟肼、利福平等联合应用, 还可用于耐药结核病的治疗。但近年来 EMB 耐药形势严峻, 我国复治结核病患者中 EMB 耐药率已达 17.2%, 并呈上升趋势; 耐多药结核病患者中, EMB 耐药率约为 51.3%~66.7%, 情况不容乐观。明确 EMB 耐药的产生机制对于有效防控 EMB 耐药率的上升、充分发挥 EMB 的作用十分重要, 因此本文对结核分枝杆菌 EMB 的耐药现状、EMB 的作用机制及其耐药产生机制方面的研究进展进行了综述。

关键词: 结核分枝杆菌; 乙胺丁醇; 耐药

Progress on mechanism of ethambutol resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*

Ting Wang, Weiwei Jiao, Adong Shen

Key Laboratory of Major Diseases in Children and National Key Discipline of Pediatrics (Capital Medical University), Ministry of Education, Beijing Key Laboratory of Pediatric Respiratory Infection Diseases, Beijing Pediatric Research Institute, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, Beijing 100045, China

Abstract: The occurrence and prevalence of multidrug-resistant tuberculosis poses a serious threat to the global tuberculosis control. Ethambutol (EMB) is one of the first-line anti-tuberculosis drugs, which is usually used in combination with isoniazid and rifampicin for treating pan-sensitive tuberculosis, and it can also be used in drug-resistant tuberculosis. However, the situation of EMB resistance is alarmingly high, especially in multi-drug resistant tuberculosis. In China, EMB resistance rate in the previously treated cases was up to 17.2% and showed an increased tendency. What was worse, 51.3%–66.7% of multidrug-resistant tuberculosis cases were resistant to EMB. Thus, it is important to understand the drug resistance mechanism of EMB, which will help to slow down the drug resistance rate of EMB. In this review, we focus on the current status of EMB resistance, the effects of EMB and the mechanisms of EMB resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; ethambutol; drug resistance

收稿日期: 2016-04-01; 修回日期: 2016-07-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号 81271889, 30901632)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81271889, 30901632)]

作者简介: 王婷, 博士研究生, 专业方向: 儿内科学。E-mail: wangting_0225@163.com

通讯作者: 申阿东, 硕士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 儿童呼吸感染性疾病。E-mail: shenad16@hotmail.com

DOI: 10.16288/j.ycz.16-111

网络出版时间: 2016/8/5 10:21:00

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160805.1021.004.html>

结核病(Tuberculosis, TB)是一种古老的疾病,由结核分枝杆菌感染引起,目前,结核病仍是全世界范围内最危险的传染病之一,患病率和死亡率居高不下。据 2015 年世界卫生组织全球结核病报告^[1]估计,全球约有 3.3%的新发结核病和 20%复治结核病患者为耐多药结核病[Multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB, 定义为结核分枝杆菌至少对利福平(Rifampicin, RIF)和异烟肼(Isoniazid, INH)耐药],目前全球 MDR-TB 患者约有 30 万人,但 MDR-TB 的治愈率仅有 50%,2014 年约有 19 万人死于 MDR-TB。由此可见,耐药结核病,尤其是 MDR-TB 的防控迫在眉睫。

乙胺丁醇(Ethambutol, EMB)是 1961 年发现的具有抗分枝杆菌活性的合成药物,并于 1966 年开始用于结核病的治疗,目前是治疗 TB 的一线药物。EMB 可以抑制分枝杆菌生长,但不能影响停止复制的细菌,是结核病治疗的重要药物,常与 INH、RIF 等联合应用,可延缓二者耐药性的产生;另外,EMB 还可以用于治疗耐药结核病,是治疗 MDR-TB 的第一组药物。为了更好地发挥它的重要作用,有效防控其耐药率的上升,明确 EMB 耐药的产生机制十分重要,本文主要总结了结核分枝杆菌中乙胺丁醇的耐药现状、乙胺丁醇的作用机制及其耐药的产生机制。

1 结核分枝杆菌乙胺丁醇耐药现状

EMB 是治疗 TB 和 MDR-TB 的重要药物,但是目前我国 EMB 耐药形势十分严峻,在一项我国十省市的耐药情况调查中^[2],新发病例 EMB 耐药率为 3.3%,而复诊病例中则达到 14.5%,其中内蒙古地区的复诊病例中 EMB 耐药率更是高达 31.8%;随后 2007 年的全国耐药结核病基线调查^[3]发现,新发病例中 EMB 耐药率为 4.9%,而复诊病例中则达到 17.2%,较之前我国十省市耐药情况调查的结果有所上升。另外,EMB 耐药很少单独出现,常与其他抗生素耐药同时存在,在 MDR-TB 中,EMB 耐药的比例很高,情况不容乐观。欧洲一项研究显示,MDR-TB 中 EMB 耐药占 53%,其中在东欧国家为 71%,而非东欧国家则为 48%^[4]。我国的情况与此类似,近期一些研究显示,中国 MDR-TB 中 EMB 耐药所占比例约为 51.3%~66.7%^[5~7]。

2 EMB 耐药产生机制

结核分枝杆菌细胞壁的组成成分主要是肽聚糖、阿拉伯半乳聚糖和分枝菌酸,其中以阿拉伯半乳聚糖为主,细胞壁外层的分枝菌酸与内层的肽聚糖由中间层的阿拉伯糖半乳聚糖连接,故而阿拉伯半乳聚糖对于细胞壁的完整性起着重要的作用。EMB 是一种阿拉伯糖类类似物,通过抑制阿拉伯糖基转移酶,抑制阿拉伯糖基聚合入细胞壁中的阿拉伯半乳聚糖和阿拉伯甘露糖脂,干扰细胞壁的生物合成(图 1),破坏结核分枝杆菌细胞壁的完整性,进而导致细菌死亡^[8,9]。EMB 耐药的产生主要是由影响阿拉伯半乳聚糖生物合成及生物活性的相关基因突变所致。

2.1 阿拉伯糖基转移酶编码和调节相关基因突变

2.1.1 阿拉伯糖基转移酶编码基因突变

结核分枝杆菌的 *embCAB* 基因座长约 10 kb,包含 3 个连续的基因,分别是 *embC*、*embA* 和 *embB*,其编码蛋白均为阿拉伯糖基转移酶,但各自的生物学功能又不尽相同。其中,*embA* 和 *embB* 主要与阿拉伯半乳聚糖的合成相关,*embC* 则与阿拉伯甘露糖脂的合成相关。研究显示,结核分枝杆菌 EMB 耐药性的产生主要与 *embCAB* 基因座突变相关,且以 *embB* 突变为主,目前大多数已发现的突变集中在 *embB* 上一段长 576 bp 的区域,又称为乙胺丁醇耐药决定区(Ethambutol resistance-determining region, ERDR),此区域的突变会导致阿拉伯糖基转移酶结构改变、EMB 结合位点及药物-蛋白质相互作用改变,从而导致 EMB 耐药^[10]。

基因 *embB* 的 306 位密码子发生氨基酸置换时,会改变菌株对 EMB 的敏感性,产生 EMB 耐药,这一位点突变在临床分离株中最为常见,EMB 耐药菌株中此位点突变率约为 68%^[11],由此可见,*embB*306 突变与 EMB 耐药之间关系密切,因而,*embB*306 突变被认为是产生 EMB 耐药的主要原因。然而,有研究在 EMB 敏感的临床菌株中也发现了 *embB*306 突变^[12,13],尤其是一项世界范围的大型研究^[14]发现,46%的 *embB*306 突变菌株对 EMB 敏感。有学者认为,这一现象可能是由于不同培养基中 EMB 的活性存在差异所致,也有可能是由于 EMB 敏感株和耐药株之间的 MIC 值差异太小所导致的^[15]。有研究发现,

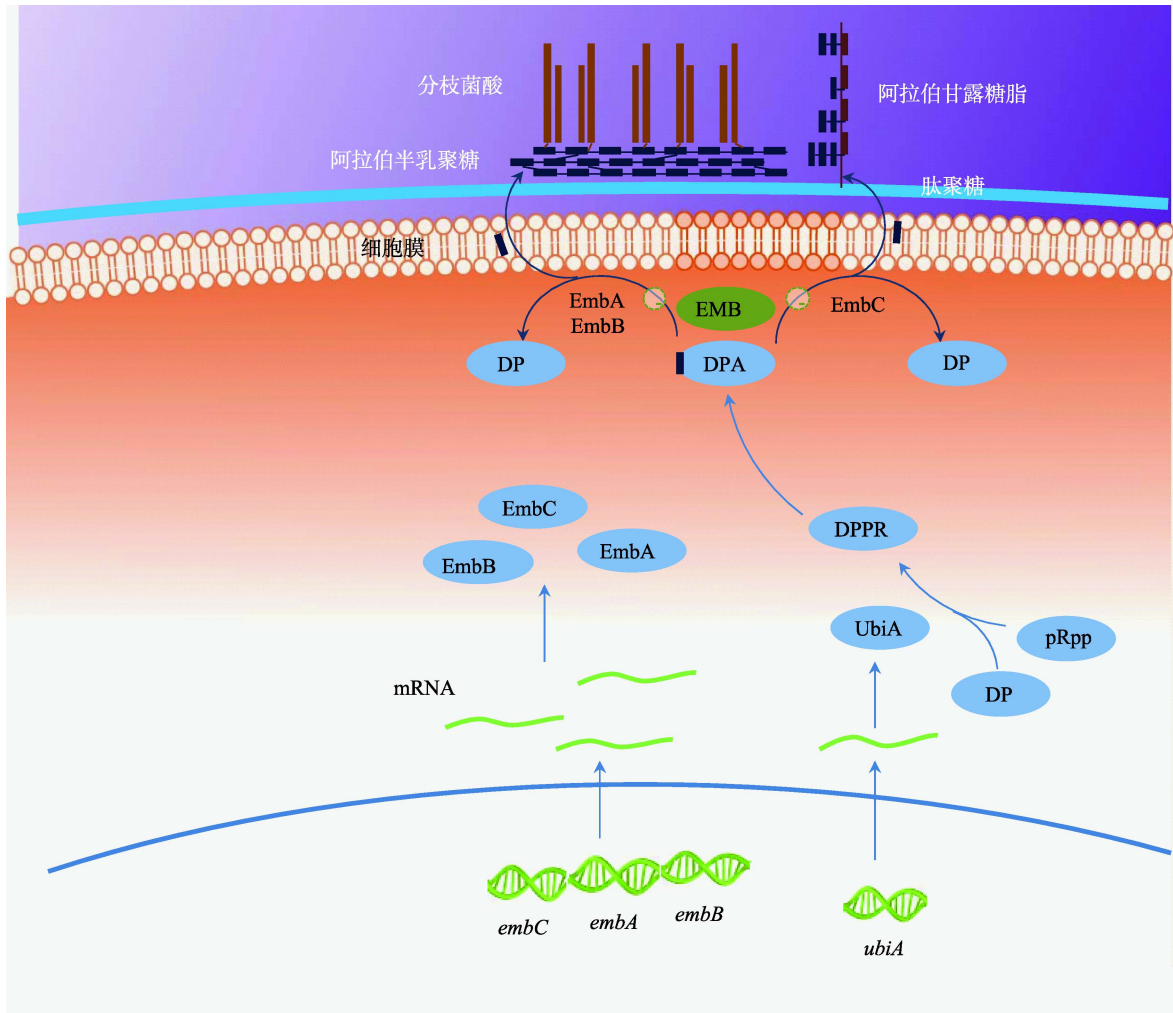


图 1 结核分枝杆菌中 EMB 作用机制图

Fig. 1 Mechanism of EMB in *Mycobacterium tuberculosis*

DPA: 聚十异戊二烯磷酸-β-D-阿拉伯糖(Decaprenylphosphoryl-β-D-arabinose), 是阿拉伯糖基的供体; DPPR: 聚十异戊二烯磷酸-β-D-5-磷酸核糖(Decaprenyl-phosphoryl-β-d-5-phosphoribose); DP: 聚十异戊二烯磷酸(Decaprenylphosphate); pRpp: 磷酸核糖焦磷酸(Phosphoribose diphosphate); UbiA: 磷酸核糖转移酶; EmbC、EmbA、EmbB: 阿拉伯糖基转移酶。

采用肉汤培养基最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentrations, MIC)检测 EMB 耐药性时, 菌株对 EMB 的耐药性与 *embB* 突变之间的一致性更高^[5]。基于此, Safi 等^[16]针对 *embB306* 与 EMB 耐药之间的关系进行了深入研究, 以结核分枝杆菌临床分离株为研究对象, 进行 *embB306* 等位基因交换实验, 结果显示当 EMB 敏感株的 *embB306* 位点由野生型 ATG 突变为 ATA、ATC、CTG、GTG 时, 菌株对 EMB 的 MIC 由 2 μg/mL 分别增至 7 μg/mL、7 μg/mL、8.5 μg/mL 和 14 μg/mL, 从而证明 *embB306* 突变是 EMB 低/中水平耐药的原因之一。同时, 该研究也发现 *embB306* 突变是 EMB 高水平耐药的必要条件,

但单独的 *embB306* 突变并不能导致 EMB 高水平耐药(MIC > 20 μg/mL), 可能需通过与其他基因突变的相互作用间接导致 EMB 高水平耐药, 也就是说, EMB 高水平耐药的形需要多步完成, 而 *embB306* 突变发生在这一过程的早期, 仅可导致菌株对 EMB 的 MIC 值小幅增高。Safi 等还发现携带 *embB306* 突变的菌株更易发展为 INH 或 RIF 耐药和 MDR, 且可能削弱联合使用抗结核药物的作用, 因此在治疗过程中, 发生 *embB306* 突变的菌株更易发展为 MDR。此外, 还有研究发现 86% 的 MDR 菌株中存在 *embB306* 突变, 且 *embB306* 突变可使 MDR 产生风险增加 12 倍, EMB 耐药合并 MDR 的风险增加 17

倍^[17]。上述研究均显示, *embB306* 突变在推动 RIF 和 INH 耐药的产生和导致 MDR 方面意义重大, 这可能是由于 *embB306* 突变时会通过改变阿拉伯半乳糖或阿拉伯甘露糖脂的结构或数量, 从而影响结核分枝杆菌细胞壁的渗透性和削弱抗结核药物的协同作用所致^[16]。

尽管 *embB306* 突变与 EMB 耐药性之间的关系存在一定争议, 但 *embB306* 突变在临床上仍被用于快速诊断 EMB 耐药的标记物。一项 meta 分析显示, *embB306* 作为 EMB 耐药诊断标记物的敏感性和特异性分别为 67.9% 和 79.9%^[18]。另外, 由于 EMB 耐药与 RIF 耐药或 MDR 形成之间关系密切, 也有学者评估了 *embB306* 突变作为 MDR 诊断标记物的价值^[17], 结果显示, *embB306* 诊断 INH、RIF 和 EMB 同时耐药的敏感性和特异性分别为 82% 和 97%。虽然上述研究结果提示 *embB306* 有作为诊断耐药结核分枝杆菌标记物的潜力, 但尚需进一步大规模验证。

一些临床研究发现除 *embB306* 突变外, *embCAB* 操纵子上其他位点突变也可导致 EMB 耐药, 常见的突变位点是 *embB406* 和 *embB497*, 且研究发现这两种突变可出现在 EMB 高水平耐药菌株中^[19]。随后, 有研究在 EMB 敏感的临床菌株中也检测到 *embB406* 突变^[20]。为了确定这些基因突变与 EMB 耐药之间的关系, Safi 等^[21]通过功能研究证明了 *embB406* 和 *embB497* 单独突变可导致 EMB 耐药, 且与 EMB 低水平耐药相关; 但 *embB406* 和 *embB497* 突变与 INH 和 RIF 耐药的产生无明显相关性, 这点与 *embB306* 突变不同, 可能是由于 *embB406* 和 *embB497* 突变时不存在类似改变结核分枝杆菌细胞壁渗透性的效应。

除 *embB* 外, *embCAB* 基因座上其他基因突变也可导致 EMB 耐药。*embC* 的突变频率仅次于 *embB*, 该基因也是阿拉伯糖基转移酶的编码基因。有研究显示 *embC* 亦是 EMB 的直接作用靶点, 即便没有 *embB* 突变, *embC* 过量表达也可导致 EMB 高水平耐药, 甚至当 *embC* 与 *embB*、*ubiA* 联合突变时会导致 EMB 极高水平耐药^[22]。

另外, 还有研究显示, EMB 耐药菌株中 15% 的突变位于 *embC-embA* 基因区间^[23]。与没有 *embC-embA* 基因区间突变的菌株相比, 携带该区间突变的菌株 *embA* 和 *embB* mRNA 表达量增高^[24]; 另外, 与单独 *embB* 突变的菌株相比, *embC-embA* 基因区间和

embB 联合突变的菌株耐药水平增高明显, 且 *embA* 和 *embB* mRNA 的表达水平亦明显增高^[23]。这些研究结果都提示, *embC-embA* 基因区间突变会使 *embA* 和 *embB* 的转录水平增高, 从而导致 *embA* 和 *embB* 过量表达, 影响阿拉伯糖基转移酶活性, 进而导致 EMB 高水平耐药^[25]。

除 *embCAB* 基因座外, 其上游基因 *Rv3792* 也是阿拉伯糖基转移酶的编码基因, 虽然其编码蛋白的过量表达并不能直接引起 EMB 耐药, 但 *Rv3792* 却可以通过激活内源启动子使 *embC* 的转录增加, 从而产生 EMB 耐药^[22,26]。

2.1.2 阿拉伯糖基转移酶调节基因突变

embR 是阿拉伯糖基转移酶的活性调节基因, 目前研究认为该基因突变也可能是 EMB 耐药的产生机制之一^[27]。不同的研究中 EMB 耐药菌株 *embR* 突变率差异较大, 2015 年徐玉辉等^[25]对我国 767 株临床菌株进行研究, 发现 *embR* 突变率仅为 3.7%。而有些研究在 EMB 耐药菌株中并未发现 *embR* 突变^[24]。

2.2 十异戊二磷酸-β-D-阿拉伯糖合成和利用途径相关的基因突变

近年来研究发现, 参与 MTB 细胞壁中阿拉伯半乳糖的前体—聚十异戊二磷酸-β-D-阿拉伯糖 (Decaprenylphosphoryl-β-D-arabinose, DPA) 合成和利用的相关基因突变也与 EMB 耐药相关^[22]。

ubiA (即 *Rv3806c*) 是磷酸核糖转移酶的编码基因, 与 DPA 的生物合成有关, 是决定结核分枝杆菌生长、生存能力的重要基因。直接和间接的证据均证明, 虽然 *ubiA* 本身不是 EMB 的直接作用靶点, 但当它发生突变时会通过提高细胞内的 DPA 水平, 竞争性抑制 EMB 与其靶点 *EmbB* 结合, 从而导致 EMB 耐药, 这一现象的发现也为药物研发提供了新方向。

ubiA 突变使 DPA 水平增高的机制尚不完全清楚, 目前认为其机制可能是通过加速聚十异戊二磷酸 (Decaprenylphosphate, DP) 转化为 DPA 前体聚十异戊二磷酸-β-D-5-磷酸核糖 (Decaprenyl-phosphoryl-β-d-5-phosphoribose, DPPR) 实现的。无论 *embB306* 是否突变, *ubiA* 突变都会引起 DPA 合成增加, 从而导致 EMB 中高水平耐药^[26]。Safi 等^[22]也证实, 当 *ubiA* 突变联合 *embB* 突变时会导致 EMB 高水平耐药。

EMB 耐药是一个复杂的过程,与多种基因突变相关(表 1),且常在多个基因突变共同作用下发生。Safi 等^[22]指出, *embB* 突变通常是 EMB 耐药产生的首要步骤,而 *embB* 基因上的非典型位点、*ubiA*、*embC*、*Rv3792* 或其他未知基因上的突变也有可能作为 EMB 耐药产生过程中的第一步出现。EMB 高水平耐药多是由于几个基因突变相互作用的结果,这是一个逐步累积的过程,就如 *ubiA* 突变联合 *embB* 突变时会导致高水平 EMB 耐药。

2.3 外排泵在 EMB 耐药中的作用

外排泵系统在结核分枝杆菌 EMB 耐药的产生过程中也发挥了一定的作用。外排泵是一种质膜蛋白,当抗生素进入细菌内部发挥作用时,其外排泵基因可过度表达,使外排泵相关蛋白表达上调,将

细胞膜内的各种药物排出细胞,以保护细胞免受毒害,使细菌得以生存,从而形成耐药。目前在细菌中发现的外排泵共有 5 种类型^[32],包括易化超家族(Major facilitator super family, MFS)、ATP 结合盒家族(ATP-binding cassette family, ABC)、小多重耐药家族(Small multidrug resistant family, SMR)、耐药结节化细胞分化家族(Resistance-nodulation-division family, RND)和多耐药及毒性化合物外排家族(Multidrug and toxic compound extrusion, MATE),目前结核分枝杆菌中仅发现了前 4 种,其中以 ABC 和 MFS 为主。结核分枝杆菌中最常见、最重要的外排泵类型是 ABC 外排泵。外排泵多为多药外排泵,常与 MDR 的形成有关,如目前已被发现的 *Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c* 外排泵系统、外排泵 *Rv1747c* 等,与 RIF、INH、STR、EMB 耐药以及 MDR-TB 和广谱耐药形

表 1 结核分枝杆菌 EMB 耐药相关基因

Table 1 The genes involved in EMB resistance in *Mycobacterium tuberculosis*

基因	功能	突变率(%)	氨基酸或核酸突变位点	参考文献
<i>embB</i>	编码阿拉伯糖基转移酶,与阿拉伯半乳糖的合成相关	61~85.3	Leu74Arg, Ser297Ala, Met306Ile ^a , Met306Leu ^a , Met306Val ^a , Tyr319Asp, Tyr319Ser, Asp328Gly, Asp328Tyr, Phe330Val, Tyr334His, Asp354Ala, Glu378Ala, Asn399Thr, Leu402Val, Pro404Ser, Glu405Asp, Gly406Asp, Gly406Ala, Gly406Ser, Gly406Gly, Met423Thr, Ser426Asn, Ile450Met, Ala454Thr, Gly459Asp, Thr496Asn, Gln497Lys, Gln497Pro, Gln497Arg, Thr630Ile, Gly745Asp, Asp959Ala, Pro965Pro, Met1000Arg, Asp1024Asn, 1995g-a(silent), 2982c-t(silent), 3081g-a(silent),	[11, 23, 24, 28~31]
<i>embC</i>	编码阿拉伯糖基转移酶,与阿拉伯甘露糖脂的合成相关	2.8	Thr270Ile, Glu305Asp, Asn394 Asp, Ile406Val, Arg738Gln, Val981Leu, 1239g-a(silent)	[11, 23, 28, 31]
<i>embA</i>	编码阿拉伯糖基转移酶,与阿拉伯半乳糖的合成相关	3.7	Asp4Asn, Gly5Ser, Gln38Gln, Cys76Cys, Leu105Val, Arg380Pro, Val122Gly, Val125Gly, Val343Leu, Ala201Thr, Gly321Ser, Gly350 Asp, Ala462Val, Val468Ala, Ala576Thr, Pro639Ser, 988c-t(silent), 1851a-g(silent), 1995c-t(silent), 2124c-t(silent)	[11, 23, 28, 31]
<i>embC-embA</i> 基因区间	—	15	-c8a, -c8t, -c11a, -c11t, -c12t, -c16t, -c16g, -c16a, -25a del, -27t del, -32g del, -41a del	[11, 23, 24, 31]
<i>embR</i>	编码转录调控子 EmbR,调节阿拉伯糖基转移酶的活性	3.7	Pro49Ala, Gly84Gly, Ser104Asn, Pro243Ser, Gln379Arg, 462c del	[11, 28]
<i>Rv3792</i>	编码阿拉伯糖基转移酶	—	Leu198Leu	[22]
<i>ubiA</i>	编码 DPA 合酶	8.3	Ala38Thr, Val49Leu, Glu149Asp, Ile179Thr, Val188Ala, Leu198Leu, Ile206Ile, Ala237Val, Arg240Cys, Pro245Pro, Ala249Gly, Gly269Gly	[22, 28]

注: ^a: *embB* 密码子 306 突变在临床分离株中最为常见,耐药菌株中此位点突变率约为 68%。

成相关^[33,34]; 基因 *Rv2459(jefA)* 所编码的外排泵, 也被证实与 INH 和 EMB 耐药以及多耐药的形成有关^[35]。目前认为这些外排泵是潜在的药物靶点, 一些化合物可以通过耗竭外排泵转运所需能量、干扰外排泵组装和阻碍底物通过外排通道等方式达到抑制其功能的目的, 称为外排泵抑制剂, 它可以抑制细菌对药物的外排作用、增加细菌内的药物存留时间以至恢复其对药物的敏感性。这就为结核病的治疗提供了新的思路, 即外排泵抑制剂可作为新型抗结核药物与其他药联合应用治疗结核病。目前已发现多种外排泵抑制剂, 且其作用已得到实验证实, 如 Ca^{2+} 通道拮抗剂(维拉帕米和吩噻嗪类药物)、质子载体类药物(CCCP、DNP 和缬氨霉素)和植物外排泵抑制剂(利血平、胡椒碱和黄连素), 但是目前关于这些药物的研究主要是针对其对 RIF 和 INH 等药物耐药的影响的, 其对 EMB 耐药的效果尚有待进一步研究证实^[36]。

3 结 语

EMB 的耐药机制比较复杂, 涉及多个基因。但总的来说, 其耐药性的产生主要是与阿拉伯半乳糖的生物合成或其生物活性的改变有关。随着科技的进步, 越来越多的新技术逐渐被应用于 EMB 耐药机制的研究, 如二代基因测序技术可以使我们从全基因组水平探讨 EMB 的耐药机制。此外, 各种组学平台包括代谢组学、蛋白质组学、表观遗传学等也为 EMB 耐药机制的研究提供了新的视角, 如赖氨酸琥珀酰化就被发现可能与结核分枝杆菌 EMB 耐药相关^[37]。这些对于人们深入了解结核分枝杆菌对 EMB 耐药的产生过程, 寻找新的抗结核药物作用靶点, 从而更好地控制耐药结核病的产生和传播都具有非常重要的意义。

参考文献(References):

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Geneva: World Health Organization, 2015. [DOI]
- [2] He GX, Zhao YL, Jiang GL, Liu YH, Xia H, Wang SF, Wang LX, Borgdorff MW, van der Werf MJ, van den Hof S. Prevalence of tuberculosis drug resistance in 10 provinces of China. *BMC Infect Dis*, 2008, 8(1): 166. [DOI]
- [3] Zhao YL, Xu SF, Wang LX, Chin DP, Wang SF, Jiang GL, Xia H, Zhou Y, Li Q, Ou XC, Pang Y, Song YY, Zhao B, Zhang HT, He GX, Guo J, Wang Y. National survey of drug-resistant tuberculosis in China. *N Engl J Med*, 2012, 366(23): 2161–2170. [DOI]
- [4] Gonzalo X, Hutchison DC, Drobniewski FA, Pimkina E, Davidaviciene E. Multidrug-resistant tuberculosis in the United Kingdom and Lithuania. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2014, 18(6): 663–665. [DOI]
- [5] Zhang ZJ, Wang YG, Pang Y, Kam KM. Ethambutol resistance as determined by broth dilution method correlates better than sequencing results with *embB* mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(2): 638–641. [DOI]
- [6] Chen QY, Pang Y, Liang QF, Lin SF, Wang YF, Lin J, Zhao Y, Wei SZ, Zheng JF, Zheng SH. Molecular characteristics of MDR *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Fujian, China. *Tuberculosis*, 2014, 94(2): 159–161. [DOI]
- [7] Shi DW, Li L, Zhao YL, Jia Q, Li H, Coulter C, Jin Q, Zhu GF. Characteristics of *embB* mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Henan, China. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66(10): 2240–2247. [DOI]
- [8] Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr Opin Chem Biol*, 1997, 1(4): 579–588. [DOI]
- [9] Jankute M, Grover S, Rana AK, Besra GS. Arabinogalactan and lipoarabinomannan biosynthesis: structure, biogenesis and their potential as drug targets. *Future Microbiol*, 2012, 7(1): 129–147. [DOI]
- [10] Srivastava S, Ayyagari A, Dhole TN, Nyati KK, Dwivedi SK. *emb* nucleotide polymorphisms and the role of *embB306* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* resistance to ethambutol. *Int J Med Microbiol*, 2009, 299(4): 269–280. [DOI]
- [11] Ramaswamy SV, Amin AG, Göksel S, Stager CE, Dou SJ, El Sahly H, Moghazeh SL, Kreiswirth BN, Musser JM. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(2): 326–336. [DOI]
- [12] Ahmad S, Jaber AA, Mokaddas E. Frequency of *embB* codon 306 mutations in ethambutol-susceptible and-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kuwait. *Tuberculosis*, 2007, 87(2): 123–129. [DOI]
- [13] Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, Narvskaya O. Detection of *embB306* mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from northwestern Russia: implications for genotypic resistance testing. *J*

- Clin Microbiol*, 2002, 40(10): 3810–3813. [DOI]
- [14] Hazbón MH, Bobadilla del Valle M, Guerrero MI, Varma-Basil M, Filliol I, Cavatore M, Colangeli R, Safi H, Billman-Jacobe H, Lavender C, Fyfe J, García-García L, Davidow A, Brimacombe M, León CI, Porras T, Bose M, Chaves F, Eisenach KD, Sifuentes-Osornio J, Ponce de León A, Cave MD, Alland D. Role of *embB* codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* revisited: a novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(9): 3794–3802. [DOI]
- [15] Madison B, Robinson-Dunn B, George I, Gross W, Lipman H, Metchock B, Sloutsky A, Washabaugh G, Mazurek G, Ridderhof J. Multicenter evaluation of ethambutol susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by agar proportion and radiometric methods. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(11): 3976–3979. [DOI]
- [16] Safi H, Sayers B, Hazbón MH, Alland D. Transfer of *embB* codon 306 mutations into clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains alters susceptibility to ethambutol, isoniazid, and rifampin. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(6): 2027–2034. [DOI]
- [17] Cuevas-Córdoba B, Juárez-Eusebio DM, Almaraz-Velasco R, Muñoz-Salazar R, Laniado-Laborin R, Zenteno-Cuevas R. Mutation at *embB* codon 306, a potential marker for the identification of multidrug resistance associated with ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(9): 5455–5462. [DOI]
- [18] Feng Y, Liu SJ, Wang QG, Wang L, Tang SW, Wang JM, Lu W. Rapid diagnosis of drug resistance to fluoroquinolones, amikacin, capreomycin, kanamycin and ethambutol using genotype MTBDRsl assay: a meta-analysis. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55292. [DOI]
- [19] Parsons LM, Salfinger M, Clobridge A, Dormandy J, Mirabello L, Polletta VL, Sanic A, Sinyavskiy O, Larsen SC, Driscoll J, Zickas G, Taber HW. Phenotypic and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to both isoniazid and ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(6): 2218–2225. [DOI]
- [20] Srivastava S, Garg A, Ayyagari A, Nyati KK, Dhole TN, Dwivedi SK. Nucleotide polymorphism associated with ethambutol resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Microbiol*, 2006, 53(5): 401–405. [DOI]
- [21] Safi H, Fleischmann RD, Peterson SN, Jones MB, Jarrahi B, Alland D. Allelic exchange and mutant selection demonstrate that common clinical *embCAB* gene mutations only modestly increase resistance to ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(1): 103–108. [DOI]
- [22] Safi H, Lingaraju S, Amin A, Kim S, Jones M, Holmes M, McNeil M, Peterson SN, Chatterjee D, Fleischmann R, Alland D. Evolution of high-level ethambutol-resistant tuberculosis through interacting mutations in decaprenylphosphoryl- β -D-arabinose biosynthetic and utilization pathway genes. *Nat Genet*, 2013, 45(10): 1190–1197. [DOI]
- [23] Brossier F, Sougakoff W, Bernard C, Petrou M, Adeyema K, Pham A, Amy de la Breteque D, Vallet M, Jarlier V, Sola C, Veziris N. Molecular analysis of the *embCAB* locus and *embR* gene involved in ethambutol resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in France. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(8): 4800–4808. [DOI]
- [24] Cui ZL, Li YY, Cheng S, Yang H, Lu JM, Hu ZY, Ge BX. Mutations in the *embC-embA* intergenic region contribute to *Mycobacterium tuberculosis* resistance to ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(11): 6837–6843. [DOI]
- [25] Belanger AE, Besra GS, Ford ME, Mikusová K, Belisle JT, Brennan PJ, Inamine JM. The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(21): 11919–11924. [DOI]
- [26] He L, Wang XB, Cui P, Jin JL, Chen JZ, Zhang WH, Zhang Y. *ubiA* (Rv3806c) encoding DPPR synthase involved in cell wall synthesis is associated with ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 2015, 95(2): 149–154. [DOI]
- [27] Moure R, Español M, Tudó G, Vicente E, Coll P, Gonzalez-Martin J, Mick V, Salvadó M, Alcaide F. Characterization of the *embB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Barcelona and rapid detection of main mutations related to ethambutol resistance using a low-density DNA array-authors' response. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(8): 2299–2300. [DOI]
- [28] Xu YH, Jia HY, Huang HR, Sun ZG, Zhang ZD. Mutations found in *embCAB*, *embR*, and *ubiA* genes of ethambutol-sensitive and -resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China. *BioMed Res Int*, 2015, 2015: 951706. [DOI]
- [29] Park YK, Ryoo SW, Lee SH, Jnawali HN, Kim CK, Kim HJ, Kim SJ. Correlation of the phenotypic ethambutol sus-

- ceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* with *embB* gene mutations in Korea. *J Med Microbiol*, 2012, 61(4): 529–534. [DOI]
- [30] Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, Kreiswirth BN, Moghazeh SL, Jacobs WR Jr, Telenti A, Musser JM. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41(8): 1677–1681. [DOI]
- [31] Plinke C, Cox HS, Zarkua N, Karimovich HA, Braker K, Diel R, Rüschi-Gerdes S, Feuerriegel S, Niemann S. *embCAB* sequence variation among ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates without *embB306* mutation. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(7): 1359–1367. [DOI]
- [32] Liu H, Xie JP. Comparative genomics of *Mycobacterium tuberculosis* drug efflux pumps and their transcriptional regulators. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2014, 24(2): 163–180. [DOI]
- [33] Pei H, Zhang SL, Liu J, Dai YX, Huang B, Wang X, Hu MT, Kuai SG, Wang K. The role of ABC efflux pump, Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c, from *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in China. *Folia Microbiol*, 2011, 56(6): 549–553. [DOI]
- [34] Spivey VL, Whalan RH, Hirst EM, Smerdon SJ, Buxton RS. An attenuated mutant of the Rv1747 ATP-binding cassette transporter of *Mycobacterium tuberculosis* and a mutant of its cognate kinase, PknF, show increased expression of the efflux pump-related *iniBAC* operon. *FEMS Microbiol Lett*, 2013, 347(2): 107–115. [DOI]
- [35] Gupta AK, Reddy VP, Lavania M, Chauhan DS, Venkatesan K, Sharma VD, Tyagi AK, Katoh VM. *jefA* (Rv2459), a drug efflux gene in *Mycobacterium tuberculosis* confers resistance to isoniazid & ethambutol. *Indian J Med Res*, 2010, 132(2): 176–188. [DOI]
- [36] Pule CM, Sampson SL, Warren RM, Black PA, van Helden PD, Victor TC, Louw GE. Efflux pump inhibitors: targeting mycobacterial efflux systems to enhance TB therapy. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(1): 17–26. [DOI]
- [37] Xie LX, Yu ZX, Guo SY, Li P, Abdalla AE, Xie JP. The roles of epigenetics and protein post-translational modifications in bacterial antibiotic resistance. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(8): 793–800.
- 谢龙祥, 于召箫, 郭思瑶, 李萍, Abdalla AE, 谢建平. 表观遗传和蛋白质翻译后修饰在细菌耐药中的作用. *遗传*, 2015, 37(8): 793–800. [DOI]

(责任编辑: 谢建平)